

Aus dem Anatomischen Institut der Universität Kiel
(Direktor: Prof. Dr. BARGMANN).

Über den histotopochemischen Nachweis von Vitamin C in Ganglienzellen der weißen Ratte.

Von
ERICH PACKHÄUSER.

Mit 1 Textabbildung.

(Eingegangen am 10. Juni 1945.)

I. Einleitung und Fragestellung.

Eine ganze Reihe von Untersuchungen der letzten 10 Jahre (PLAUT u. BÜLOW 1934, DIEHL u. NEUMANN 1930, Lit. bei CLARA 1942) beschäftigt sich mit der Feststellung von Menge und Lokalisation der 1-Ascorbinsäure im Nervensystem des Menschen und der Tiere, nicht zuletzt unter dem Eindruck klinischer Beobachtungen und Erwägungen. Mit dem von GIROUD und LEBLOND entwickelten histotopochemischen Nachweis von Vitamin C ist es anscheinend möglich geworden, die bisher auf dem Wege chemischer Untersuchungen gewonnenen Befunde über den Gehalt des Nervensystems an Vitamin zu präzisieren und den Anteil der Gewebelemente des Nervensystems am Vitamin-C-Haushalt bis zu einem gewissen Grade sichtbar zu machen.

Die ersten histologischen Untersuchungen über das Vorkommen von Vitamin C im Zentralnervensystem normaler, d. h. nicht mit Ascorbinsäure vorbehandelter Menschen stammen von BARGMANNs Schüler LEOPOLD (1941). Als wesentlichstes Ergebnis der Arbeit LEOPOLDS kann die Feststellung gelten, daß jene Nervenzellen eine besonders starke schwarze Reaktion aufweisen, welche Abnutzungspigment enthalten. Somit kann der Ausfall der GIROUDschen Reaktion an Nervenzellen nach LEOPOLD nicht unbesehen als Vitamin-C-Nachweis gewertet werden. Daneben freilich kommen zarte Silberkörnchen auch in pigmentfreien Zellen wie den PURKINJE-Zellen von Mensch und Meerschweinchen vor. In systematischer Weise hat dann CLARA (1942) die verschiedenen Anteile des Nervensystems 15 anscheinend gesunder Erwachsener mit der gleichen Methode untersucht. In Bestätigung der Angaben LEOPOLDS bejaht CLARA die Möglichkeit der Schwärzung von Lipofusinkörnchen durch die sog. Vitamin-C-Reaktion, doch werden nicht nur, wie eine Reihe von Beispielen lehrt, die Körnchen des Abnutzungspigmentes geschwärzt.

Die Befunde von LEOPOLD und CLARA lassen meines Erachtens bei der Beurteilung sog. positiver Reaktionsbilder des Nervengewebes große Vorsicht geboten erscheinen, zumal neuerdings auch STEEGE auf Grund seiner Beobachtungen an der Schilddrüse (1945) gegenüber MATZKE (1943) hervorhebt, daß von einem histotopochemischen Nachweis in Gewebselementen nur dann gesprochen werden dürfe, wenn die Vitaminreaktion nach vorheriger Ascorbinsäurezufuhr an solchen Zellen positiv ausfällt, die normalerweise keine schwarze Reaktion geben. Aus diesem Grunde müssen auch die neuen Angaben von SCHAFFENROTH (1944) über das Vorkommen von Vitamin C in verschiedenen menschlichen Organen mit großem Vorbehalt aufgenommen werden. Es ist denkbar, daß eine Vitamin-C-Reaktion durch histologisch nicht erfaßbare reduzierend wirkende Pigmentvorstufen, also andersartige Substanzen verursacht wird. Die Frage nach der Beteiligung der verschiedenen Gewebsbestandteile des Nervensystems muß mithin auf experimentellem Wege bearbeitet werden. Die vorliegende Untersuchung stellt sich die Aufgabe, unter Heranziehung der Ergebnisse von Vitalfärbungsversuchen das Verhalten der Ganglien- und Mantelzellen von Rückenmarks- und Kiemenbognennerven gegenüber einem Angebot von Vitamin C zu studieren. Wie den Veröffentlichungen von TONUTTI, BARGMANN und STEEGE entnommen werden kann, besteht in der cytologischen wie histotopographischen Lokalisation der Speicherung von Trypanblau und histologisch darstellbarem Vitamin C weitgehende Übereinstimmung. Diese kann auch für das Nervensystem erwartet werden.

Seit den Untersuchungen von GOLDMANN (1913), DOINIKOW (1913), BEHNSEN (1927) und anderen Forschern wissen wir, daß eine Speicherung von Vitalfarbstoffen in den Ganglien- und Gliazellen des Zentralnervensystems nur bei hoher Dosierung und über längere Zeit sich erstreckender Zufuhr von Farbstoff in verhältnismäßig geringfügigem Ausmaß erfolgt. Dies gilt auch für die Nervenzellen peripherischer Ganglien von Tieren, denen Trypanblau und andere saure Vitalfarbstoffe angeboten wurden (NAWRATZKY 1934, SELL 1935, CHRIST 1937). Zunächst kommt es in den Ganglien zu einer Speicherung im Stützgewebe, d. h. den zwischen den Nervenzellen befindlichen Histiocyten, dann nehmen die Mantelzellen den Farbstoff auf, zuletzt die Ganglienzellen selbst. Die Farbstoffspeicherung in den Nervenzellen tritt als Ablagerung zarter Granula ohne bezeichnende Lokalisation im Cytoplasma in Erscheinung. Eine eindeutige Beziehung zwischen Intensität der Speicherung und Nervenzelltyp scheint entgegen den Angaben von TSCHETSCHUJEWA (1930) nicht zu bestehen (CHRIST 1937). Dagegen berichtet SELL (1935) über Unterschiede in der Speicherung in den Ganglien der weißen Maus. Beispielsweise erwähnt SELL, daß im Ganglion semilunare seiner

Versuchstiere nur wenige, in sympathischen Ganglien alle Zellen gespeichert haben. Ebenso lassen die Mantelzellen verschiedener Ganglien Unterschiede in der Speicherung erkennen. TSCHETSCHUJEWA beobachtete in den Mantelzellen der Spinalganglien eine intensivere Speicherung von Trypanblau als in jenen der vegetativen Ganglien. Es ist bisher nicht möglich, eine befriedigende Erklärung für dieses unterschiedliche Verhalten zu geben. SELL findet im Ganglion semilunare allenthalben eine starke Farbablagerung in den Mantelzellen, während die Satelliten in den vegetativen Ganglien weniger stark hervortreten. Ziel meiner Untersuchung war es nun, die Ergebnisse der Vitalfärbungsstudien mit denen der Vitamin-C-Methode zu vergleichen.

Das Ausmaß der Speicherung von Vitalfarbstoffen im Nerven- wie auch in anderen Geweben wird nicht allein durch physikalische und Stoffwechseleigentümlichkeiten der speichernden Elemente bestimmt, sondern auch durch die Permeabilität der Blut-Cytoplasmaschranke. Dies scheint z. B. durch die Untersuchungen BEHNSENs (1927) am Zentralnervensystem verschieden alter Tiere dargetan zu werden, die bei Jungtieren eine stärkere Farbablagerung als bei ausgewachsenen Individuen ergeben haben. BEHNSEN nimmt eine stärkere Durchlässigkeit der lebenden Gefäßmembran bei den noch wachsenden Tieren an. Es war daher angezeigt, die Aufnahme von Vitamin C durch die Zellelemente des Nervengewebes junger Tiere mit derjenigen erwachsener Versuchstiere zu vergleichen.

Experimentell, d. h. durch Röntgenbestrahlung hervorgerufene Veränderungen der Durchlässigkeit der Blut-Gehirnschranke hat SCHOLZ (1935, Hund) beschrieben. Es handelt sich hier um Reaktionen am Gefäßapparat, die beim erwachsenen Tier erst einige Wochen nach intensiver Bestrahlung mit dem Durchtritt hyalinähnlicher Massen aus der Blutbahn in das Gehirngewebe manifest werden. Ich habe die Frage geprüft, ob eine Änderung der Permeabilität der Gefäßschranke nach Bestrahlung mit Hilfe der Vitamin-C-Reaktion vielleicht bereits vor dem Auftreten grobmorphologischer Hirnveränderungen sichtbar gemacht werden kann.

II. Material und Methodik.

Zur Untersuchung gelangten 12 weiße Ratten, denen Vitamin C (Redoxon, Cantan) in Dosen von 1—3 ccm subcutan verabfolgt wurde. Tötung nach 15—330 Min. Zehn weitere Tiere erhielten parenterale Gaben von Trypanblau und Vitamin C. Tötung 20—30 Min. nach der Vitamininjektion. Die Trypanblauzufuhr ging der Verabreichung von Vitamin C voraus. Einzelheiten über die Dosierung im Text. Vier erwachsene Ratten wurden der Röntgenbestrahlung ausgesetzt und anschließend mit Vitamin C (einmalige Injektion von 2 ccm) behandelt.

Tötung nach 30 Min. Strahlendosis: Filter 4 mm Aluminium, 80 bis 100 kV, Dauer 25 Min., 1—2 Erythemdosen. Die genaueren Angaben gingen infolge Kriegseinwirkung verloren. Zahl der nicht mit Vitamin behandelten Kontrolltiere: 5.

Der histologische Nachweis von Vitamin C erfolgte nach der bekannten Methode von GIROUD und LEBLOND (vgl. ROMEIS 1943). Paraffin-Celloidineinbettung nach PÉTERFI, Schnittdicke 6—8 μ , Kernfärbung mit Kernechtrot.

III. Befunde.

1. *Kontrollversuche.* Fünf Ratten mit einem Gewicht von 80—120 g wurden nach Tötung mit Äther einige Spinalganglien entnommen, die ich in der vorgeschriebenen Weise in angesäuertes Silbernitrat überführte. Das Schnittpräparat zeigt weder in den Ganglien noch in den Mantelzellen Spuren einer positiven Reaktion. Das Hervortreten der bekannten RANVIERSchen Kreuze an den Schnürringen stellt eine unspezifische Reaktion dar, die auch unter der Einwirkung nichtangesäuerten Silbernitrates entsteht.

2. *Vitamin-C-Zufuhr.* Sechs Ratten im Gewicht von 108—185 g erhielten je eine subcutane Injektion von 1 ccm Redoxon. Die Tötung der Tiere erfolgte nach 30 Min.

In einer Reihe von Spinalganglienzellen von fünf nach $\frac{1}{2}$ stündiger Einwirkung von Vitamin C getöteten Tieren sind — von einem Falle sehr schwacher Reaktion abgesehen — staubartig feine Silbergranula in diffuser Verteilung nachweisbar. Die Zellen des Plexus myentericus enthalten nur ganz vereinzelte schwarze Körnchen. Im Cytoplasma der Mantel- und Bindegewebszellen der Ganglien finde ich nur wenige Silbergranula. Wie zu erwarten, zeichnen sich die Hauptstücke der Nierenkanälchen durch starke Reaktion aus. In drei Fällen fiel auch der Vitamin-C-Nachweis in den Histiocyten der Schilddrüse positiv aus, und zwar weit stärker als in den Bindegewebszellen der Spinalganglien.

Erfolgt die Tötung mit Redoxon (1 ccm) behandelter Tiere bereits nach 20 bis 25 Min. (2 Ratten), so ist in den Ganglienzellen eine wesentlich schwächere Reaktion zu erzielen, während Nierenkanälchen und Bindegewebszellen der Thyreoidea zahlreiche schwarze Granula aufweisen. Nach längerem Abstand zwischen subcutaner Injektion und Tötung (4 Tiere) habe ich recht uneinheitliche, vielleicht auf individuelle Unterschiede in der Vitaminausscheidung zu beziehende Ergebnisse erhalten. Einem kaum nennenswerten Vorhandensein zarter Silbergranula im Cytoplasma der Spinalganglienzellen nach einstündiger Redoxoneinwirkung steht z. B. eine etwas stärkere Reaktion nach einem Zeitabschnitt von 120, 165 und 210 Min. gegenüber. Auch in diesen Fällen enthielten die Mantelzellen nur spärliche Granula. Die Silber-

reaktion in den Mantelzellen ist also bemerkenswerterweise durchweg unauffällig.

3. *Zufuhr von Trypanblau und Vitamin C.* Zehn Ratten im Gewicht von 30, 33, 34, 37, 83, 122 und 125 g erhielten nach vorausgegangener Speicherung von Trypanblau subcutane Injektionen von 0,3—1 ccm Redoxon bzw. Cantan. Die Tötung der Tiere wurde 20 bis 30 Min. nach der Vitaminzufuhr vorgenommen.

In den Nervenzellen einer 30 g schweren, 3mal mit 0,5 ccm Trypanblau behandelten Ratte, die nach 20 Min. getötet worden war, ist weder eine granuläre Trypanblauausspeicherung noch eine Silberreaktion festzustellen. Dagegen enthalten die Mantelzellen in Nähe des Zellkerns befindliche Farbgranula sowie schwarze Körnchen gleichen Kalibers, vielfach von einer blauen Hülle umgeben. Die gleiche Kombination von Farbstoffablagerung und Vitamin-C-Reaktion sieht man in den Fibrocyten der Ganglien; auch die Histiocyten der Schilddrüse sind, wenngleich in stärkerem Maße, durch den Besitz blauer und schwarzer Einschlüsse zugleich gekennzeichnet. Eine kaum nennenswerte Silberreaktion bei äußerst spärlichem Vorkommen von Trypanblaugranulis findet sich in den Mantel- und Bindegewebszellen der Ganglien eines 34 g schweren, in gleicher Weise behandelten Tieres. Bei einem der gleichen Serie angehörigen Versuchstier von 67 g Körpergewicht, in dessen Niere und Schilddrüse (Histiocyten) eine deutliche Trypanblauspeicherung und Vitaminreaktion am gleichen Ort nachzuweisen ist, konnte ein grundsätzlich gleiches Bild beobachtet werden. Die Bindegewebszellen der Ganglien sind etwas stärker mit Farbstoff und Silberkörnchen beladen. Minimale Farbablagerung und Silberreaktion stellte ich auch in den Mantel- und Bindegewebszellen einer 83 g schweren Ratte fest, die binnen 3 Tagen 2,5 ccm Trypanblau und anschließend 1 ccm Cantan erhalten hatte. (Tötung nach 30 Min.). Die Ganglienzellen waren auch in den zuletzt erwähnten Fällen völlig frei.

Die Übereinstimmung in der Lokalisation von saurem Vitalfarbstoff und Vitamin-C-Reaktion wird besonders durch Versuche mit hochgetriebener Trypanblauspeicherung und hoher Redoxondosierung dargestellt. Bei einer erwachsenen Ratte, die in 5 Injektionen insgesamt 8 ccm Trypanblau erhalten hatte und anschließend 2 ccm Redoxon parenteral zugeführt bekam, ist sowohl eine intensive Farbspeicherung in allen Mantelzellen als auch eine zartblaue Trypanblauablagerung in einer Reihe von Ganglienzellen festzustellen (Abb. 1). Die Farbkörnchen liegen bevorzugt an den Polen der ovalen Kerne der Mantelzellen bzw. diffus im Cytoplasma der Nervenzellen. Die in beiden Zellformen gleichzeitig vorkommenden Trypanblaukörnchen und Silbergranula lassen sich nicht immer scharf gegeneinander abgrenzen, da die Silberkörnchen auch hier vielfach von blauen Hüllen umschlossen zu sein scheinen. Die

Silberreaktion in den Ganglienzellen erstreckt sich übrigens auf nur wenige Granula. Auch im Ganglion semilunare überwiegt Speicherung und Silberreaktion in den Mantelzellen bei weitem jene in den nervösen Elementen. Die Bindegewebszellen der Schilddrüse und des Darmtraktes sind ebenfalls mit blauen und schwarzen Körnchen beladen. In den Spinalganglien eines weiteren erwachsenen Tieres, das nur 1,5 ccm Trypanblau binnen 3 Tagen und anschließend 1 ccm Redoxon erhielt, ist der geringen Dosis entsprechend kaum eine Reaktion und

Speicherung in den Nervenzellen auszumachen, während die Mantelzellen Farbstoff- und Silberkörnchen in etwas stärkerem Umfange enthalten.

Vergleicht man die Ergebnisse der Redoxonversuche mit denen der kombinierten Trypanblau- und Redoxonzufuhr, so gewinnt man den Eindruck, daß die Silberreaktion in den Mantel- und Bindegewebszellen zuvor mit Trypanblau behandelte Tiere stärker ausfällt als bei Tieren, welche lediglich Vitamin C erhalten hatten. Es erscheint daher angezeigt, der Frage nachzugehen, ob das vorherige Eindringen des Vitalfarbstoffes — vielleicht mit einer Permeabilitätsänderung der Blut-Gewebsschranke verbunden — das spätere Eindringen des Vitamins begünstigt.

4. *Bestrahlungsversuche.* Röntgenbestrahlte erwachsene Ratten

Abb. 1. Spinalganglienzelle einer erwachsenen weißen, mit Trypanblau und Vitamin C behandelten Ratte (s. Text). Trypanblau-Speicherung (grau wiedergegeben) und positive Vitamin-C-Reaktion (schwarz) in den Nervenzellen, ferner in Mantel- und Bindegewebszellen. (Schnittdicke 6 μ , Kernechtstofffärbung, Zeiß H I 120, Ok. 10fach, auf $\frac{3}{10}$ verkleinert. Gez. BARGMANN.)

(1—2 Erythemdosen) erhielten 1—2 Tage nach der Bestrahlung 1 ccm Redoxon subcutan. Die Tötung der Tiere wurde 30 Min. nach der Injektion vorgenommen. Weder die Ganglien- noch die Mantelzellen weisen irgend eine Abweichung des Bildes der Vitamin-C-Reaktion von dem bei nichtbestrahlten Tieren erhältlichen auf. Entsprechend den bisher gemachten Erfahrungen zeigt das Gewebe keine Spur einer deutlichen strukturellen Veränderung.

Zusammenfassung.

1. Die Vitamin-C-Reaktion (GIROUD u. LEBLOND) fällt in den Spinalganglien- und Mantelzellen normaler weißer Ratten negativ aus.

2. Nach parenteraler Zufuhr von Vitamin C (1 cem, Tötung nach 30 Min.) lassen sich mit der Vitamin-C-Reaktion in manchen Spinalganglienzellen staubartig feine Silberkörnchen zur Darstellung bringen. Die Reaktion in den Mantelzellen ist unauffällig. Altersunterschiede finden im Reaktionsbild keinen Ausdruck.

3. Nach vorangegangener Trypanblauinjektion, die zu der bekannten schwachen Farbablagerung in den Spinalganglienzellen und etwas stärkeren Speicherung in den Mantel- und Bindegewebszellen führt, ist nach Vitaminzufuhr eine positive Reaktion in den farbstoffhaltigen Elementen zu erzielen. Der saure Vitalfarbstoff und das Vitamin C werden somit auch im Bereiche des Nervensystems am gleichen Ort verankert. Es hat den Anschein, daß die vorherige Farbstoffspeicherung die Aufnahme des Vitamins begünstigt, da die Vitamin-C-Reaktion in den Mantelzellen in den Kombinationsversuchen stärker ausfällt als in den Fällen der Redoxversuche.

4. Kurze Zeit nach Röntgenbestrahlung ist eine Abweichung des Reaktionsbildes vom Normalzustand nicht zu beobachten.

5. Die geringe Neigung der Ganglienzellen, sich mit histotopchemisch faßbarem Vitamin C zu beladen, läßt Vorsicht gegenüber Angaben über die positiv ausfallende Reaktion in den Nervenzellen unbehandelter Menschen geraten erscheinen.

Literatur.

- BARGMANN: Zbl. inn. Med. **63** (1942). — BEHNSEN: Z. Zellforsch. **4** (1927). — CHRIST: Z. Anat. **1937**. — CLARA: Z. mikrosk.-anat. Forsch. **52** (1942). — DIEHL u. NEUMANN: Klin. Wschr. **1939**. — DOINIKOW: Fol. neurobiol. (D.) **7** (1913). — GIROUD et LEBLOND: Bull. Histol. appl. etc. **11** (1934). — GOLDMANN: Abb. preuß. Akad. Wiss., Berl., Physik.-math. Kl. **1913**, Nr 1. — LEOPOLD: Z. Zellforsch. **31** (1941). — MATZKE: Z. mikrosk.-anat. Forsch. **53** (1943). — NAWRATZKY: Z. Zellforsch. **20** (1934). — PFUHL: Z. mikrosk.-anat. Forsch. **51** (1941). — PLAUT u. BÜLOW: Z. Neur. **154** (1935/36). — ROMEIS: Taschenbuch der mikroskopischen Technik, 14. Aufl. 1943. — SCHOLZ: Klin. Wschr. **1935**. — SCHAFFENROTH: Anat. Anz. **95** (1944). — SELL: Z. Zellforsch. **22** (1935). — STEEGE: Z. Zellforsch. **33** (1945). — TONUTTI: Z. mikrosk.-anat. Forsch. **42** (1937). — Z. klin. Med. **132** (1937). — Protoplasma **31** (1938). — Anat. Anz. **87**, Erg.-H. 9 (1939).